Aus dem Institut für experimentelle Therapie
„Emil von Behring", Marburg-L.
(Leiter: Professor Dr. Hans Schmidt)

Über die Bedeutung der mizellaren Größe des Antigens für die Eigenschaften des Antikörpers.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
in der Gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Marburg

vorgelegt von

Wilhelm Niemeyer
appr. Arzt aus Bremen

Marburg 1936
Buchdruckerei Karl Busch in Wattenscheid

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am 13. 7. 1936
Referent: Prof. Dr. Schmidt
Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Druck von Karl Busch in Wattenscheid

Meinen
lieben Eltern!

Gliederung.

I. Antigen und Antikörper, Sachlage und Fragestellung

II. Vergrößerung der Toxinmizellen, ihre Verwendung als Antigene

III. Methodik

1. der Antitoxinbestimmung
2. der Serumeiweißbestimmung

IV. Die Versuche

1. an Kaninchen mit Tetanusformoltoxoid
2. an Kaninchen mit Diphtherieformoltoxoid
3. an Hammeln

V. Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

I. Antigen und Antikörper, Sachlage und Fragestellung.

Über die Antigene und Antikörper ist, soweit es die in dieser Arbeit behandelte Frage betrifft, etwa soviel bekannt:

Für die Bildung der Antikörper bestehen in erster Linie zwei Auffassungen: Der Antikörper entsteht in dem Säftestrom des Körpers oder in Zellen, und zwar entweder unter dem Einfluß des Antigens oder unmittelbar aus dem Antigen. Den Vorrang nimmt bei den meisten Autoren die Ansicht ein, daß die eigentliche Bildungsstätte gewisse Zellen, vielleicht das reticulo-endotheliale System, sind, von wo aus die Antikörper erst ins Blut gelangen. Sie weisen — das ist mit ziemlicher Gewißheit zu sagen — eine sehr weitgehende Spezifität auf und sind mit dem Globulin des Serums untrennbar verbunden. Wenn es auch gelang, Antikörper soweit zu reinigen, daß das Globulin mit chemischen Methoden als Eiweiß nicht mehr nachweisbar war (Huntoon, Olitzky u. a.), so ist eine völlige Trennung von Eiweiß noch nicht bewiesen. Denn man muß in Betracht ziehen, daß selbst in einem hochwertigen Immunserum nur ein relativ kleiner Teil des Serumglobulins empfindlicher ist als der chemische Nachweis von Eiweiß. Nehmen wir die reticulo-endothelialen Zellen als Bildungsstätte der Antikörper an, so scheint es zwei Möglichkeiten zu geben: Der Antikörper ist selbst ein Eiweiß, oder er hat keine Eiweißnatur und verbindet sich mit dem Globulin des Serums, sobald er ins Blut gelangt. Die Entscheidung für eine dieser beiden Auffassungen wird erst dann getroffen werden können, wenn es das antikörperhaltige Eiweiß des Serums quantitativ zu messen gelingt. Zur Zeit überwiegt bei weitem die erstere Annahme, nach der die Antikörper in Zellen gebildet werden und als Globulin in das Blut gelangen. Weiterhin stehen noch zwei Anschauungen über den Charakter der Antikörper einander gegenüber. Die eine faßt die einzelnen Antikörper als untereinander wesensverschieden auf, indem sie sich auf die Verschiedenheit ihrer Reaktionsarten (Agglutination, Präzipitation, Komplementbindung, Cytolyse, Bakteriotropie u. a.) stützt. Nach der anderen, unitarischen Theorie sind viele dieser Antikörper in Wirklichkeit nur ein einziger, der sich aber nach den Eigenschaften des Antigens und den Bedingungen, unter denen sich die Antigen-Antikörper-Reaktion abspielt, ganz verschieden äußern kann.

H. Zinsser, der hauptsächlich die unitarische Auffassung vertritt, teilt die Antigene in zwei allgemeine Gruppen. Zu der einen rechnet er alle Substanzen bakterieller, tierischer oder pflanzlicher Herkunft, die im Blute des mit ihnen immunisierten Tieres antitoxische Eigenschaft, die spezifische Neutralisierung, aufweisen. Die andere Gruppe umfaßt alle Eiweißkörper, die zur Bildung von Cytolysinen, Agglutininen und Präzipitinen führen und die selbst unwirksam sind und nicht die Eigenschaften eines Toxins oder Fermentes besitzen.

Die von den Antigenen der ersten Gruppe gebildeten Antitoxine sind im Serum vornehmlich an das hydrophile Pseudoglobulin gebunden, das aber als solches, wenigstens in dem hydrophilsten Teil, sicher nicht gleichzeitig auch Träger derjenigen Antikörper ist, die durch die Antigene der zweiten Gruppe erzeugt werden. Daher trennte man die Antitoxine als besondere Klasse von den übrigen Antikörpern. Die Neutralisation von Toxin und Antitoxin folgt weitgehend dem Gesetz der multiplen Proportionen. Darauf beruhen die bekannten Auswertungsverfahren am Tier (Ehrlich). Später zeigte es sich, daß Toxin und Antitoxin bei ihrer Reaktion miteinander in vitro eine sichtbare Flockung geben können (Ramon). In einer Reihe quantitativ abgestufter Toxin-Antitoxin-Mischungen tritt die zeitlich erste Flockung in dem Röhrchen ein, wo die Mischung praktisch neutral ist, aber die ausgeflockte Eiweißmenge enthält nicht wie ursprünglich angenommen das gesamte Toxin und Antitoxin. Ein nicht geringer Anteil von beiden bleibt vielmehr in der überstehenden Flüssigkeit (Schmidt, Scholz und Perry). Einige Forscher vertreten daher die Ansicht, die Flockung werde gar nicht durch eine Einwirkung von Antitoxin hervorgerufen, sondern es handele sich um eine Diphtherie-Eiweiß-Antieiweißflockung, die durch einen Diphtherie-Antieiweißkörper verursacht wird, den das immunisierte Tier zwangsläufig bildet, da es gleichzeitig z. B. mit dem Diphtherietoxin unvermeidlich Diphtheriebazilleneiweiß injiziert bekommt. Solch eine Eiweiß-Anti-Eiweißflockung konnte auch nachgewiesen werden. Sie kann sogar als Doppelflockung, also getrennt von der echten Toxin-Antitoxinflockung auftreten und auch experimentell erzeugt werden (Schmidt, Scholz). Nun hat man durch weitgehende Reinigung der Pseudoglobuline Sera hergestellt, die Antitoxine enthalten, aber nicht mehr die Toxin-Antitoxin-Flockungsreaktion in vitro aufweisen. Demnach gibt es zwei Arten von Antitoxinen, die beide die Neutralisation mit Toxin gemeinsam haben, von denen aber nur die eine Art zu flocken vermag, die andere nicht. Als Träger des flockenden Antitoxins wird das relativ hydrophobe Globulin angenommen, während das nicht flockende Antitoxin an das hochlyophile Pseudoglobulin gebunden ist. Diese an Pseudoglobulin gebundene Art ist in den üblichen Diphtheriesera oft mehr enthalten als die erstere.

Worin ist nun der Grund dafür zu suchen, daß die Antitoxine an die Pseudoglobuline, daß aber die Antikörper mit den serologischen Reaktionen in vitro (Cytolysine, Agglutinine, Präzipitine) durchweg an die mehr hydrophoben (Eu-) Globuline gebunden sind?

Den Anstoß zur vorliegenden Arbeit gab die Auffassung, daß die mizellare Größe des Antigens für die Art der Globuline, an die die Antikörper gebunden sind, ausschlaggebend ist. So soll die relative Kleinheit der Toxinmizellen maßgebend für den mehr hydrophilen Charakter des antitoxischen Pseudoglobulins sein.

Stimmt diese Ansicht, so muß sich durch Vergrößerung der Toxinmizellen auch der Globulincharakter der Antitoxine verändern lassen, was die Versuche dieser Arbeit zeigen sollen.

II. Vergrößerung der Toxinmizellen, ihre Verwendung als Antigene.

Anstatt des relativ labilen Toxins wurde zur Immunisierung das beständige Formoltoxoid oder Anatoxin benutzt, um während der Versuchszeit ein stets gleichmäßiges Ausgangsprodukt zu haben. Zur Vergrößerung der Anatoxinmizellen wurde das Anatoxin an die Teilchen einer Kollodiumsuspension adsorbiert. Diese Kollodiumsuspension wurde nach der von J. Freund beschriebenen Methode von J. Loeb hergestellt. Es wurde so durch fraktioniertes Zentrifugieren eine Suspension von leicht und vollständig abschleuderbaren Teilchen von annähernd gleicher Größe erhalten. Die Suspensionsdichte wurde nach der Kapillarzentrifugiermethode von H. Schmidt bestimmt. Zudem kam zu einer Reihe von Versuchen eine opaleszente stabile Kollodiumsuspension zur Anwendung, die ebenfalls durch fraktionierte Zentrifugation gewonnen wurde, deren Teilchen aber so klein waren, daß sie nicht mehr abschleuderbar waren. Beide Arten von Suspensionen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, der keinerlei antiseptische Mittel zugesetzt waren, um durch etwaige Änderung der Grenzflächenspannung nicht die Adsorptionsfähigkeit der Kollodiumteilchen für das Diphtherietoxin zu beeinträchtigen.

In allen Versuchen kamen ausschließlich Tetanus- bzw. Diphtherie-Formoltoxoide (Anatoxine) zur Anwendung, da die Toxine für die Dauer der Versuche über Monate hindurch keine genügende Gewähr für ihre Stabilität gaben. In Kaninchenversuchen wurden ein durch Fällung mit Methylalkohol gereinigtes Tetanus-Formoltoxoid, ein Diphtherie-Rohanatoxin, sowie ein gereinigtes Diphtherie-Anatoxin benutzt. An Hammeln wurden Versuche ebenfalls mit Diphtherie-Anatoxin ausgeführt. Obwohl die intravenöse Immunisierungsart bekanntermaßen bei weitem nicht zu so hohen Antitoxintitern führt wie etwa die subkutane Immunisierung, wurden, um die Versuche eindeutiger zu gestalten, Kaninchen wie Hammel nur intravenös immunisiert.

Näheres hierüber wird weiter unten in der Besprechung der einzelnen Versuche gebracht.

III. Methodik der Antitoxin- und der Serumeiweiß-Bestimmung.

In erster Linie waren hier zwei Bestimmungen an den Kaninchen- bzw. Hammelsera notwendig:

Die Bestimmung des Tetanus- und Diphtherie-Antitoxintiters, die Serumeiweißbestimmung.

Ihre Methodik — im wesentlichen die der letzteren Bestimmungsart — möchte ich hier der Übersicht halber und um Wiederholungen zu vermeiden, vor den Besprechungen der einzelnen Versuche erwähnen.

1. Die Methoden der Antitoxinbestimmung

Sie lehnen sich denen in dem Werk: „Die Praxis der Auswertung von Toxinen und Antitoxinen" von H. Schmidt angeführten eng an.

Die Antitoxinbestimmungen geschehen nur in vivo, am Tier, für das Tetanusserum an der weißen Maus nach der deutschen Methode der Tetanusantitoxinbestimmung (Ehrlichsche Methode).

Limes — Tod —, Wert (L +) eines Tetanusgiftes = Diejenige geringste Menge, die mit $^1/_{100}$ alte deutsche Antitoxin-Einheit (AE) im Gesamtvolumen von 4 ccm vermischt eine Maus von 16 g in 4 Tagen tötet, wenn man von der Mischung 0,4 ccm subkutan in die Lendengegend des Tieres injiziert. Auswertung mittels eines bekannten Testtoxins in Tier-Reihen-Versuchen.

Zur Auswertung des Serums der mit Diphtherietoxoid immunisierten Tiere kamen zwei Methoden zur Anwendung: Die intrakutane und die subkutane Auswertung am Meerschweinchen.

Die letztere hat den Vorzug, eine genauere Untersuchungsmethode zu sein, sie erfordert aber eine größere Anzahl von Versuchstieren. Bei der intrakutanen Methode (Römer), die auch kleinere Einzelmengen und Seren mit nur geringem Titer auszuwerten gestattet, lassen sich an einem Meerschweinchen bis zu 8 Proben gleichzeitig vornehmen. Man hat außerdem den Vorzug, daß das Tier nicht unbedingt eingeht und später irgendwie weiter verwendbar bleibt.

Am besten kombiniert man beide Methoden, indem man die intrakutane zur schnelleren und sparsameren Auffindung des ungefähren Wertes der subkutanen vorausschickt.

Dem Intrakutanverfahren liegt der Limes — Necroticans — Wert (L n) zugrunde. Es ist das die geringste Toxinmenge, die mit $^1/_{100}$ A E im Volumen von 2 ccm eine Mischung gibt, von der 0,1 ccm intrakutan injiziert eine Reaktion verursacht, die am 4. Tage zu einer geringen Nekrose führt.

Das subkutane Verfahren (Ehrlich) benutzt von einem stabilen Prüfungsgift diejenige Toxinmenge (L + Wert), die mit 1 A E eines Serums gemischt nach halbstündiger Bindungszeit und subkutaner Injektion ein Meerschweinchen von 250 g Gewicht am 4. Tage tötet.

2. Die Methoden der Serumeiweißbestimmung

Sie lehnt sich an die von Knipping und Kowitz angegebene und von Starlinger und Harte vereinfachte Methode an.

a) Technik der Gesamteiweißbestimmung, gravimetrische Methode.

In Erlenmeyer-Kölbchen mit Destillations-Glaskirschen-Verschluß werden 2 cc. Serum mit 30 cc. Aqua dest. versetzt und stehen etwa 10—15 Minuten bis zum Eintritt von Opaleszenz auf kochendem Wasserbad. Tropfenweise wird dann $^1/_{10}$ normale Essigsäure zugesetzt. Die Kölbchen kommen auf das kochende Wasserbad zurück, bis die überstehende Flüssigkeit klar geworden ist. Etwa nach 24 bis 36 Stunden folgt dann Auswaschen auf Papierfiltern mit Aqua dest. Die Papierfilter sind vorbehandelt, d. h. sie haben zwei Stunden im Trockenschrank bei 120 Grad und eine halbe Stunde im Exsiccator gestanden und sind in gezeichneten Wägegläschen vorgewogen. Das Filtrat wird während des Auswaschens mit Silbernitrat geprüft und es wird solange gewaschen, bis eine Opaleszenz bei Silbernitratzusatz eben nicht mehr auftritt. Dann wird mit Alkohol und Äther eine Nachspülung vorgenommen. Die Filter kommen zur Trocknung zurück in die Wägegläschen und stehen 3 Stunden im Trockenschrank und ½ Stunde im Exsiccator. Alsdann Wiegen.

Beispiel zur Errechnung der Prozente aus den Grammgewichten:

Gewicht des Wägegläschens mit dem Filter + dem Eiweiß	= 10,1040 g
" " " " " " vorher	= 9,9500 g
Gesamteiweiß in 2 ccm Serum	= 0,1540 g

b) Technik zur Bestimmung des Eiweißgehaltes der Zentrifugate aus den Ammoniumsulfatfällungen, gravimetrische Methode.

Zu einer konstanten Serummenge wird nach Verdünnen mit

Aqua destillata in steigenden Mengen gesättigte Ammoniumsulfatlösung hinzugesetzt.

Fällungsschema:

Das Fällungsschema entstammt der Biochemischen Zeitschrift, Band 215, 1. bis 3. Heft, S. 118, aus H. Schulze und H. Groß: „Fraktionierung und Konservierung hämolytischer Immunsera".

	Sättigungsgrad in %	Angewandte Serummenge in cc.	Verdünnungswasser in cc.	Gesamte Ammonsulfatlösung in cc.
1.	28	2	3,76	2,24
2.	30	2	3,60	2,40
3.	33	2	3,36	2,64
4.	35	2	3,20	2,80
5.	40	2	2,80	3,20
6.	45	2	2,40	3,60
7.	50	2	2,00	4,00
8.	55	2	1,60	4,40
9.	60	2	1,20	4,80
10.	65	2	0,80	5,20

Diese 10 Gemische stehen 24 Stunden in geschlossenen Gefäßen (Zentrifugengläser mit Gummistopfen) und werden dann gut zentrifugiert (bei 3—11 000 Umdrehungen).

Verwendet wird das Zentrifugat, eine klare Flüssigkeit. Soviel von dieser Flüssigkeitsmenge aus dem Glase gut abpipettiert werden kann, wird zum Gesamtvolumen von 15 ccm mit Aqua dest. aufgefüllt. Diese Mischungen stehen 2 Tage auf dem Wasserbade bis zur völligen Ausfällung des Eiweißes. (Dieses Eiweiß ist also das Gesamteiweiß minus dem durch Ammonsulfat in jeweiligem Sättigungsgrad gefällten und durch Zentrifugation entfernten Eiweiß.)

Es folgt nun Waschen auf vorbehandelten und gewogenen Filtern. Das Filtrat wird während des Waschens mit Bariumacetat geprüft, wobei diese Proben bis zum Kochen erhitzt und bis zu 2 Minuten beobachtet werden müssen.

Die Filter kommen hiernach 3 Stunden in den Trockenschrank bei 120 Grad, verweilen ½ Std. im Exsiccator und werden in ihren Wägegläschen gewogen.

Beispiel zur Errechnung der Prozentzahlen aus den Gewichten:

Gewicht des Wägegläschens mit dem Filter + dem Eiweiß = 13,1326 g
" " " " " " vorher = 13,0320 g
Eiweißmenge in 5,5 ccm des Filtrats = 0,1006 g

Die Menge des Ausgangsserums betrug 2 ccm in 8 ccm Volumen. Demnach ist der in Gramm gefundene Wert mit $^8/_2 = 4$ zu multiplizieren und durch die jeweils zur Eiweißfällung genommene ccm-Zahl zu dividieren:

$$\frac{0{,}1006 \cdot 4}{5{,}5} = 0{,}073\,163$$

Resultat mal 100 = Prozentzahl: 7,3163%

c) Technik der kolorimetrischen Methode der Eiweißbestimmung.

Sie beruht auf der Tatsache, daß Lichtstrahlen eine Flüssigkeit um so schlechter zu durchdringen vermögen, je mehr sie von einer für Licht schwer- oder undurchlässigen Substanz suspendiert oder gelöst enthält. Den Grad der Durchdringungsfähigkeit einer Flüssigkeit für Lichtstrahlen, die von einer konstanten Lichtquelle ausgehen, zu messen, dient das „lichtelektrische Colorimeter" nach Dr. B. Lange (Firma Altmann, Berlin).

Über Aufbau und Arbeitsweise soll an dieser Stelle nur soviel gesagt sein:

In einem Leichtmetallkörper ist zwischen zwei Selenhalbleiter-Photozellen eine aus dem gewöhnlichen Leitungsnetz geheizte Lichtquelle (40-W.-Opallampe) zentral angebracht. Zwischen Photozelle und Lichtquelle befindet sich jeweils eine auswechselbare Küvette, die eine (I) zur Aufnahme von klarem Wasser, die andere (II) für die zu messende Flüssigkeit bestimmt. Die von der Lichtquelle kommenden Lichtstrahlen durchdringen die Küvette, die konstant klares Wasser enthält, praktisch unbehindert und treffen die Photozelle stets in gleicher Stärke. In der zweiten Küvette läßt die zu bestimmende Flüssigkeit entsprechend dem Grade, in welchem sie eine schwer oder undurchdringliche Substanz enthält, die Lichtstrahlen weniger gut durch sich hindurch treten und auf die zugehörige Photozelle fallen. Die Selenhalbleiterphotozellen ergeben einen Strom, der sich ohne Hilfsstrom oder Verstärkereinrichtung direkt mit einem Mikroampèremeter messen läßt. Die beiden Zellen liegen in den beiden Zweigen einer Wheatstonschen Brücke, das Meßinstrument, der Milliampèremeter, im Nullzweig, so daß das Instrument stromlos ist, wenn beide Zellen gleich stark beleuchtet werden.

Die Stärke der durch die Flüssigkeit in Küvette II behinderten Strahlen zeigt eine Skala durch ihren Zeigerstand in „Belichtungseinheiten" an. Der Zeigerausschlag ist um so größer, je schwächer die Lichtstrahlen oder, da es sich ja hier um eine konstante Lichtquelle handelt, je lichtundurchlässiger die Flüssigkeit ist.

Bevor die Messung vorgenommen werden kann, müssen beide Küvetten mit klarem Wasser gefüllt und der Zeigerstand auf den Nullpunkt bzw. durch Abblendung zwischen Küvette II und deren Photozelle auf den 180°-Punkt eingestellt werden. Da die bei den Messungen gefundenen Zeigerausschläge „Belichtungs-Einheiten" wiedergeben, benötigt man zur Prozentablesung eine Eichung der Skala, und zwar für jede zu prüfende Substanz. Praktisch geht man

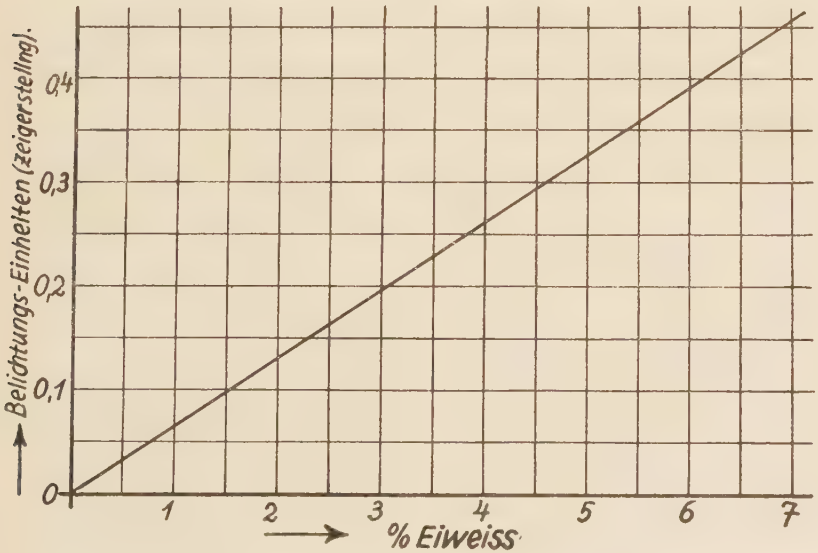
so vor, daß man zuvor durch eine andere Methode — hier im Falle der Eiweißbestimmung mit Hilfe der gravimetrischen Methode — einige Prozentwerte bestimmt und mit den betr. Werten der photometrischen Methode vergleicht und danach eine Eichfigur anlegt, die in graphischer Darstellung aus den Belichtungs-Einheiten als Ordinate, die Prozentzahlen als Abszisse direkt abzulesen gestattet. Diese Prozentzahlen geben dann lediglich darüber genauen Aufschluß, wieviel sich von der betreffenden Substanz in einem klaren, für Licht frei durchlässigen Flüssigkeitsmedium befindet.

Bei der Untersuchung eines Serums auf seinen Eiweißgehalt nach dieser Methode ist zunächst eine meßbare Trübung zu schaffen. Sie wird erreicht durch Fällung des Eiweißes mit Sulfosalicylsäure:

Das Serum wird zunächst 1:50 mit Na Cl-Lösung verdünnt. 10 ccm der Verdünnung werden in einem Guß zur 5prozentigen Sulfosalicylsäure, die mit 1prozentigem Natriumsulfat versetzt wurde, in ein Kölbchen gefügt, das gleichzeitig geschüttelt wird. Die Mischung steht 15 Minuten und wird danach mit einem Glasstab umgerührt, bei Serienauswertungen tunlichst gleichmäßig, z. B. 10 volle Kreisbewegungen in beiden Richtungen.

Ein Teil des Gemisches kommt in die 10-ccm-Küvette II, die in den Apparat eingesetzt wird. Der Zeigerstand ist sofort abzulesen, auf der Eichfigur die Prozentzahl zu bestimmen.

Nachfolgend die Eichgerade für die Sera der Versuche an Hammeln, die so gefunden wurde, daß mehrere Werte nach der gravimetrischen Methode zuvor bestimmt wurden. Die Eichfigur:



Kritik der Methode:

Die photometrische Methode ermöglicht bei Serienauswertungen ein schnelleres Arbeiten als die gravimetrische. Durch folgende Tatsache wird aber leicht eine Ungenauigkeit bedingt.

Mit der Sulfosalicylsäure erreicht man eine Eiweiß-Ausfällung mit verschieden großen Flockenbildungen, kleinsten Flöckchen bis zu größeren sich allmählich zu Boden setzenden Zusammenballungen. Von der Größe der Flocken und ihrer Raumverteilung ist aber die Lichtdurchlässigkeit bis zu einem bestimmten Grade abhängig. In Serienmessungen ist daher besonders darauf zu achten, daß durch etwaige Eingriffe, die zur gleichmäßigen Flockenverteilung vorgenommen werden, die Flockengröße in den einzelnen Proben nicht ungleichmäßig verändert wird.

Außerdem müssen die Ablesungen der Werte aller Proben tunlichst in der gleichen Zeit nach dem Zusetzen der Sulfosalicylsäure erfolgen.

Eine durchaus einwandfreie Meßmethode wird nur dann vorhanden sein, wenn eine über einen gewissen Zeitraum stabile Ausfällung von Flocken gleicher Größe bei sämtlichen Einzelproben einer Serienreihe zu erreichen ist.

Bei den später angeführten Versuchen wurden für die Hammelsera zur Kontrolle sämtliche photometrisch gefundenen Werte auch gravimetrisch festgelegt und übereinstimmend gefunden.

IV. Die Versuche.

1. Versuche an Kaninchen mit Tetanusformoltoxoid.

Die Tiere wurden nur intravenös immunisiert, ein Teil mit gereinigtem Toxoid allein, ein anderer mit an Kollodium adsorbiertem gereinigtem Toxoid.

Es wurde ein Tetanus-Anatoxin genommen, von dem 300 cc. in der Kälte gefällt mit Methylalkohol, danach in 200 cc. NaCl gelöst worden waren. Die Kaninchen 1788, 1787 und 144 bekamen von diesem Tetanus-Anatoxin allein:

Kaninchen 1788

am 13. 5. 2 cc. intravenös.
17. 5. 3 cc. i. v.
20. 5. 4 cc. i. v.
28. 5. Blutentnahme zur Prüfung des Serums auf Antitoxingehalt — $^1/_{50}$ AE (= Antitoxintiter)
28. 5. 4 cc. i. v.
2. 6. 4 cc. i. v.
23. 6. 4 cc. i. v.
5. 7. 4 cc. i. v.
13. 7. Blutentnahme — $> {}^1/_{100}, < {}^1/_{10}$ AE
20. 7. 3 cc. i. v.
26. 7. Entblutung.

Kaninchen 1787

am 13. 5. 2 cc. i. v.
17. 5. 3 cc. i. v.
20. 5. 4 cc. i. v.
28. 5. 4 cc. i. v.
2. 6. 4 cc. i. v.
23. 6. 4 cc. i. v.
5. 7. Blutentnahme ca. $^1/_{100}$ AE
5. 7. 4 cc. i. v.
20. 7. 3 cc. i. v.
26. 7. Entblutung.

Kaninchen 144

am 13. 5. 2 cc. i. v.
17. 5. 3 cc. i. v.

20. 5. 4 cc. i. v.
28. 5. 4 cc. i. v.
2. 6. 4 cc. i. v.
23. 6. 4 cc. i. v.
5. 7. 4 cc. i. v.
13. 7. Blutentnahme — $^1/_{40}$ AE
20. 7. 3 cc. i. v.
26. 7. Entblutung.

Den Kaninchen 1789 und 1790 wurde das gleiche Tetanus-Anatoxin an Kollodium gebunden injiziert. Die Adsorption des Toxoids an Kollodium war folgendermaßen ausgeführt:

Eine Mischung von 2 ccm des Formoltoxoids stand bei Zimmertemperatur eine halbe Stunde bei einer ph = 6 mit je 1 ccm einer Kollodiumsuspension von h/H = 0,2. Die Kollodiumteilchen wurden dann durch Zentrifugation abgeschleudert und mit NaCl-Lösung zweimal gewaschen, zuletzt in 4 ccm NaCl-Lösung wieder zur Suspension gebracht. Die Injektion dieser dichten Suspension in eine Ohrvene vertrugen die Tiere ausnahmslos gut.

Von (2 ccm Tet . Anatoxin + 1 ccm Kollodiumsuspension) bekam

Kaninchen 1789

am 13. 5. 1 cc. i. v.
17. 5. 1 cc. i. v.
20. 5. 1 cc. i. v.
28. 5. 1 cc. + 1 cc. NaCl i. v.
2. 6. 1 cc. + 1 cc. NaCl i. v.
23. 6. 1 cc. + 1 cc. NaCl i. v.
5. 7. 1 cc. + 1 cc. NaCl i. v.
13. 7. Blutentnahme — $^1/_{20}$ AE
20. 7. 2,5 cc. i. v.
26. 7. Entblutung.

Kaninchen 1790

am 13. 5. 1 cc. i. v.
17. 5. 1 cc. i. v.
20. 5. 1 cc. i. v.
28. 5. 1 cc. + 1 cc. NaCl i. v.
2. 6. 1 cc. + 1 cc. NaCl i. v.
23. 6. 1 cc. + 1 cc. NaCl i. v.
5. 7. Blutentnahme — ca. $^1/_{20}$ AE
5. 7. 1 cc. + 1 cc. NaCl i. v.
20. 7. 2,5 cc. i. v.
26. 7. Entblutung.

So wurde in anfangs kleineren, später größeren zeitlichen Zwischenräumen die Immunisierung mit gelegentlicher Serumantitoxinprüfung vorgenommen und über 2 Monate durchgeführt.

Nach der Entblutung der Tiere wurden die Sera in 2 Gruppen vereinigt, da die Serummenge eines einzelnen Tieres für die weitere Untersuchung sich als zu gering erwies.

Es entstanden so die zwei Sera:

A, das von den mit Anatoxin allein behandelten Tieren stammte, und

B, das von den mit Kollodium-Anatoxin immunisierten gewonnen worden war.

Von beiden Sera wurden in Gewichtsprozenten nach den beschriebenen gravimetrischen Methoden die Gesamteiweißmenge und die Verteilung des Gesamteiweißes auf eine Reihe von verschiedenen Fraktionen, 10 Fällungen mit Ammoniumsulfatkonzentrationen von 28—65%, festgestellt

Die Ergebnisse der Eiweißbestimmungen waren folgende:
Das Gesamteiweiß der Gruppe A (Anatoxin allein) betrug 7,7%.

Errechnung im einzelnen:

Gewicht des Wägegläschens mit dem Filter + Eiweiß	=	10,1046 g
„ „ „ „ „ „ vorher	=	9,9506 g
Eiweißgewicht in 2 ccm	=	0,1540 g
Eiweißmenge in Prozent	=	7,7%

Das Gesamteiweiß der Gruppe B (Kollodium-Anatoxin) war 6,09%.

Im einzelnen:

Gewicht des Wägegläschens mit dem Filter + Eiweiß	=	10,1326 g
„ „ „ „ „ „ vorher	=	10,0108 g
Eiweißgewicht in 2 ccm	=	0,1218 g
Eiweißmenge in Prozent	=	6,09%

Die einzelnen Eiweißgehalte der Zentrifugate aus den Ammoniumsulfatfällungen der Gruppe A und B:

Die Zentrifugate stellten die nach der Zentrifugation überstehenden klaren Flüssigkeiten dar. Von ihnen wurde jedesmal soviel genommen, wie sich aus den einzelnen Gläsern gut abpipettieren ließ. Dieses jeweilige Quantum wurde dann mit Aqua destillata auf das Volumen von 15 ccm aufgefüllt. Einzelheiten über Weiterverarbeitung und Prozenterrechnung sind unter Beschreibung der Methodik oben gegeben worden.

Gruppe A:

	Angewandte Flüssigkeitsmenge	+ Aqua dest. zur Auffüllung
% Sättigung		auf 15 cc. Volumen
1. 28	5,5 cc.	+ 9,5 cc. Aqua dest.
2. 30	5,5 cc.	+ 9,5 cc. „ „
3. 33	5,5 cc.	+ 9,5 cc. „ „

4.	35	5,5 cc.	+	9,5 cc.	Aqua dest.
5.	40	5,5 cc.	+	9,5 cc.	„ „
6.	45	5,0 cc.	+	10,0 cc.	„ „
7.	50	5,5 cc.	+	9,5 cc.	„ „
8.	55	5,5 cc.	+	9,5 cc.	„ „
9.	60	4,5 cc.	+	10,5 cc.	„ „
10.	65	4,0 cc.	+	11,0 cc.	„ „

Gewichtsprozente:

1.

Gewicht des Wägegläschens mit dem Filter + Eiweiß = 13,1326 g
„ „ „ „ „ „ vorher = 13,0320 g
Eiweißmenge in 5,5 cc. = 0,1006 g

Das Ausgangsserum betrug 2 cc. in 8 cc. Volumen. Demnach sind die gefundenen Werte mit $^8/_2 = 4$ zu multiplizieren: 0,1006 . 4 = 0,073 163
und durch die jeweils zur Eiweißfällung genommene cc.-Zahl zu dividieren: 5,5
Resultat mal 100 = Prozentzahl: 7,3163%

In diesem Sinne lauten die Zahlen für die weiteren Fraktionen:

2.
13,4248
13,3322
0,0926
9,26 . 4 = 6,73%
5,5

3.
15,1780
15,0950
0,0830
8,3 . 4 = 6,036%
5,5

4.
10,9190
10,8388
0,0802
8,02 . 4 = 5,837%
5,5

5.
13,9196
13,8456
0,0740
7,4 . 4 = 5,38%
5,5

6.
12,3126
12,2508
0,0618
6,18 . 4 = 4,94%
5

7.
14,5120
14,4470
0,0650
6,5 . 4 = 4,727%
5,5

8.
10,6860
10,6308
0,0552
5,52 . 4 = 4,014%
5,5

9.
14,8800
14,8502
0,0298
2,98 . 4 = 2,647%
4,5

10.

10,0976
10,0016
0,0160

1,60 . 4 = 1,60%
4

Gruppe B:

Angewandte Flüssigkeitsmenge + Aqua dest. auf 15 cc. Volumen

1. 6 cc. + 9 cc. Aqua dest.
2. 6 cc. + 9 cc. „ „
3. 6 cc. + 9 cc. „ „
4. 6 cc. + 9 cc. „ „
5. 5 cc. + 9 cc. „ „
6. 4,5 cc. + 10 cc. „ „
7. 5,5 cc. + 11,5 cc. „ „
8. 5,5 cc. + 9,5 cc. „ „
9. 5 cc. + 10 cc. „ „
10. 5 cc. + 10 cc. „ „

Gewichtsprozente:

1.

14,9068
14,8200
0,0868

8,68 . 2 = 5,786%
3

2.

13,3558
13,2706
0,0852

8,52 . 2 = 5,68%
3

3.

13,0416
12,9632
0,0784

7,84 . 2 = 5,226%
3

4.

10,8722
10,7972
0,0750

7,5 . 2 = 5,0%
3

5.

13,8940
13,8352
0,0588

5,88 . 4 = 4,70%
5

6.

12,2958
12,2446
0,0512

5,12 . 4 = 4,55%
4,5

7.

14,4892
14,4320
0,0572

5,72 . 4 = 4,16%
5,5

8.

10,6648
10,6166
0,0482

4,82 . 4 = 3,50%
5,5

9.

15,1100
15,0746
0,0354

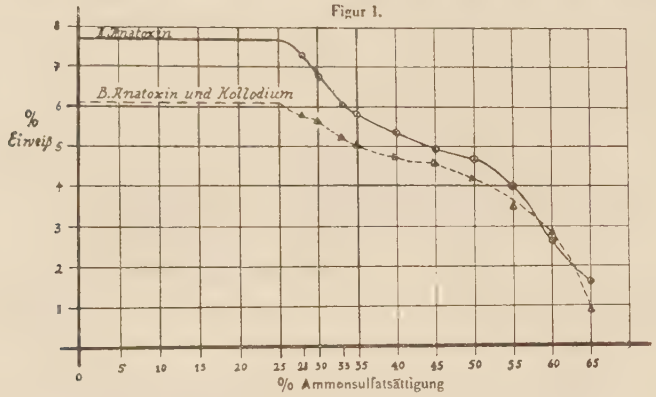
$$\frac{3{,}54 \cdot 4}{5} = 2{,}832\,\%$$

10.

10,0598
10,0486
0,0112

$$\frac{1{,}12 \cdot 4}{5} = 0{,}896\,\%$$

In folgender Figur I sind die Ergebnisse gravimetrisch dargestellt.



durchgezogen: Gruppe I = (Immunisierung mit Tetanus-Anatoxin allein)

gestrichelt: „ II = (Immunisierung mit Tetanus-Anatoxin an Kollodium gebunden)

Die Ordinate stellt in Prozenten den Eiweißgehalt des Filtrates dar, das dann gewonnen wird, wenn das Serum zu der auf der Abszisse angegebenen Konzentration mit Ammoniumsulfat gesättigt und durch Filtration vom Niederschlag befreit worden ist.

Die nächste Tabelle zeigt vergleichsweise untereinander gesetzt die Anteile des Eiweißgehaltes beider Sera in den Fällungen bei den 33-, 50- und 65prozentigen Sättigungsgrenzen.

Prozente der Ammoniumsulfatkonzentrationen

Fraktion	0—33	33—50	50—65	65—100	Gesamt-eiweißgehalt
A	0,90	2,10	3,0	1,7	7,7%
B	0,85	1,10	3,35	0,8	6,1%
N*)	1,3	1,4	ca 3,2	ca. 1,6	7,5%

*) bei normalen Kaninchen.

Unter Fraktion N sind Zahlen angegeben, die frühere Untersuchungen im Behring-Institut von Dr. H. Schultze (unveröffentlichte Arbeit) bei einem normalen Kaninchen ergeben haben.

Das Normalserum der unvorbehandelten Tiere konnte leider nicht untersucht werden, da hierfür notwendige Mengen nur durch Entblutung der Tiere hätten erzielt werden können. So ist nicht anzugeben, inwieweit durch die Immunisierung die Eiweißmengen der einzelnen Fraktionen gegenüber dem Zustand vor der Immunisierung eine Verschiebung erlitten haben.

Die bekannte Tatsache, daß bei der Immunisierung die Globuline sich auf Kosten der Albumine vermehren, geht aus einem Vergleich der unter A, B und N angeführten Zahlenwerte nicht klar hervor. Zu bedenken ist allerdings dabei, daß es sich nicht um Verhältnisse vor und nach der Immunisierung bei den gleichen Tieren handelt, und daß der durch die intravenöse Immunisierung erzielte Effekt, der Antitoxintiter, wie weiter unten angeführt wird, nur klein war.

Die Bestimmung des Antitoxingehaltes der Sera der mit Tetanus-Anatoxin immunisierten Tiere geschah ausschließlich in vivo an der weißen Maus subkutan und in indirekter Auswertung in Tierreihen-Versuchen nach der Ehrlichschen Methode. Dabei fanden sich für beide Gruppen gleiche Werte für das Gesamtserum (Nativserum).

Gruppe A	< 1/25 >	1/50 AE
Gruppe B	< 1/25 >	1/50 AE.

Ausgewertet wurden außerdem die 30-, 35- und 45prozentigen Ammoniumsulfatsättigungen beider Sera, und zwar in folgender Weise:

Sättigungs-prozent	Serummenge	Aqua dest.	Gesättigte Ammonsulfatlösung
	in cc.	in cc.	in cc.
30%	6	10,80	7,20
35%	6	9,60	8,40
45%	6	7,20	10,80

Diese Mischungen standen 24 Stunden verschlossen bei Zimmertemperatur und wurden dann zentrifugiert. Die Bodensätze der 30-prozentigen Sättigung wurden, da es sich um sehr geringe Mengen handelte, ohne weitere Verarbeitung auf ihren Antitoxingehalt untersucht.

Die Sätze der 35- und 45prozentigen Sättigungen wurden erst entsalzen, um bei den Versuchstieren eine Reizung und Schädigung durch Ammoniumsulfat auszuschließen. Sie wurden auf Tontafeln gestrichen und nach der Trocknung mit NaCl-Lösung aufgenommen und zu einem Gesamtvolumen von 6 ccm (Ausgangsmenge) wieder aufgefüllt.

Die Resultate der Auswertung zeigt die folgende Tabelle:

Ammoniumsulfat-Sättigung	30%	35%	45%	Natives Serum	Verhältnis 30% : 45%
Serum A	1/200	1/50	1/25	ca. 1/25 AE/ccm	1 : 8
Serum B	1/100	1/50	1/25	ca. 1/25 AE/ccm	1 : 4

Es ist das im ganzen — wohl infolge der intravenösen Immunisierung — ein sehr geringer Immunisierungseffekt.

Gezeigt hat sich aber, daß in der 30prozentigen Ammoniumsulfatfällung bei den mit Kollodium-Anatoxin behandelten Tieren mehr Antitoxin an hydrophobes Globulin gebunden war als bei den Tieren, die Anatoxin allein bekommen hatten.

2. Versuche an Kaninchen mit Diphtherieformoltoxoid.

Analog den Versuchen mit Tetanus-Anatoxin wurden an Kaninchen Versuche mit Diphtherie-Anatoxin vorgenommen.

Hierbei fanden ein ca. 8faches Rohanatoxin (Fabrikationsnummer 130) und ein daraus gewonnenes gereinigtes ca. 75faches Anatoxin (Fabrikationsnummer 239) Verwendung, beides wiederum allein, sowie an Kollodium gebunden.

Die Immunisierung geschah durch Injektion in eine Ohrvene in folgender Weise an insgesamt 4 Kaninchen:

Immunisierungsschema

Kan. 1756

Di.-Anatoxin roh allein (Flasche 130)

11. V. 1 cc. i. v.
13. V. 2 cc. i. v.
17. V. 2 cc. i. v.
23. V. Blutentnahme
„ „ 2 cc. i. v.
30. V. entblutet ca. 2 AE/cc.

Kan. 1761

Di.-Anatoxin ger. allein (Nr. 239)

7. V. 1 cc. i. v.
11. V. 1 cc. i. v.
13. V. 2 cc. i. v.
17. V. 3 cc. i. v.
23. V. Blutentnahme 1/10 AE
„ „ 3 cc. i. v.
30. V. Entblutung ca. 2 AE/cc.

Kan. 1769

Di.-Anatoxin roh (Fl. 130) 4 cc.
+ Kollodiumsuspension 2 cc.
30 Minuten Adsorptionszeit, zweimal gewaschen, in 8 cc. NaCl gelöst.

11. V. 1 cc. i. v.
13. V. „ „
17. V. „ „
20. V. „ „

24. V. Blutentnahme
„ „ 1 cc. i. v.
31. V. Entblutung

ca. 1 AE

Kan. 1766

Di.-Anatoxin ger. (Fl. Nr. 239) 4 cc.
+ Kollodiumsuspension 2 cc.
30 Minuten Adsorptionszeit, zweimal gewaschen, in 8 cc. NaCl gelöst.

11. V. 1 cc. i. v.
13. V. „ „
17. V. „ „
23. V. „ „
30. V. Entblutung

ca. 2 AE/cc.

Die Auswertung wurde nach der Ehrlichschen Methode indirekt subkutan an Meerschweinchen vorgenommen, für die Nativsera wie auch für eine 30- und 45prozentige Ammoniumsulfatsättigung.

Sättigungsschema:

Sättigungsprozent	Serummenge in cc.	Aqua destillata in cc.	Gesättigte Ammoniumsulfatlösung in cc.
30%	8	14,4	9,6
45%	8	9,6	14,4

Diese Mischungen standen wiederum 24 Stunden verschlossen bei Zimmertemperatur und wurden dann zentrifugiert. Die Bodensätze der 30prozentigen Sättigungen wurden der geringen Menge wegen so verwandt, die der 45prozentigen Sättigung entsalzt durch Aufstreichen auf Tontafeln, Trocknen und Lösen mit NaCl, und aufgefüllt auf das Ausgangsvolumen von 8 cc.

Die Resultate der Auswertungen zeigten folgendes Bild:

Serum der Immunisierung		Ammoniumsulfat-Sättigung 30%	45%	Natives Serum	Verhältnis 30% : 45%
Anatoxin allein	Roh-An.	0,1	2	2 AE/cc.	1 : 20
	ger.-An.	0,15	3	2 AE/cc.	1 : 20
Anatoxin u. Kollodium	Roh-An.	0,075	0,75	ca. 1 AE/cc.	1 : 10
	ger.-An.	0,2	2	2 AE/cc.	1 : 10

Auch hier wiederum ein im ganzen sehr geringer Antitoxintiter.

Der Gehalt an Antitoxin der ausfallenden Globuline in der 30prozentigen Sättigung ist wiederum relativ höher bei den mit Kollodium-Anatoxin immunisierten Tieren als bei den mit Anatoxin behandelten.

3. Die Versuche an Hammeln

Von vornherein bot ein Versuch an Hammeln zwei Vorteile: Es brauchten keine Mischsera hergestellt zu werden, da jedes Tier zur Untersuchung eine hinreichende Menge Serummaterial bot. Außerdem konnten bei den Tieren die Normalsera vor dem Beginn der Immunisierung auf Eiweißgehalt und -Fraktionen untersucht werden.

Auch hier wurde der Einheitlichkeit halber die intravenöse Immunisierungsart gewählt.

Es kamen 3 Hammel in den Versuch, Nr. 156, 157 und 158. Hammel 156 bekam Diphtherie-Anatoxin allein injiziert, Nr. 157 das gleiche Anatoxin an Kollodium gebunden. Dem Hammel 158 wurden gleichzeitig die gleichen Mengen Kollodium intravenös injiziert, die der Hammel 157 mit Anatoxin zusammen erhielt. Dabei wurden allen drei Tieren gleiche Volumina gegeben, Hammel 156 und 158 bekamen zur Erzielung derselben Menge wie beim Hammel 157 sterile physiologische Kochsalzlösung beigefügt.

Das anfangs verwandte Diphtherie-Anatoxin hatte die Herstellungsnummer 239 (B. VI, 239), es hatte einen L Ba-Wert, der 12fach war. Später kamen ebenfalls 12fache Antitoxine zur Verwendung mit den Herstellungsnummern 519 und 542.

Genommen wurde auch hier wieder die oben erwähnte feindisperse stabile Kollodiumsuspension. Das Mischungsverhältnis, Diphtherie-Anatoxin mit der Kollodiumsuspension, wurde durch Vorversuche ermittelt.

Dazu wurden verschiedene Mengen Anatoxins zu einer bestimmten Menge Koll.-Susp. gegeben. 1 Stunde Bindungszeit. Dann Filtration durch ein vorher angefeuchtetes (NaCl-Lösung) Seitzfilter.

Prüfung des Filtrates nach K r a u s schem Bindungsversuch. L Ba-Wert. (Subkutan am Meerschweinchen.)

Vom Filtrat wurde jeweils 1 cc.
mit 2 AE (Di.-Testserum Op. 3/532, 1 cc = 10 AE) versetzt
1 Stunde Bindungszeit.

Dann dazu 1 L+ (Di.-Testgift Nr. 534, L = 0,155)
½ Stunde belassen.

Davon 4 cc. sk. einem Meerschweinchen injiziert.

Als günstigstes Mischungsverhältnis wurde gefunden
Di.-Anatoxin: Kollodium = 1 : 1, da hierbei im Filtrat kein Anatoxin mehr nachweislich war.

Danach wurden im gesamten Immunisierungsversuch die Flüssigkeiten zu gleichen Teilen gemischt.

Bei Verwendung von erhitztem (sterilisierten) bzw. unerhitztem (unsterilisiertem) Kollodium zeigte sich bezüglich der Adsorption von Anatoxin kein Unterschied, so daß die Kollodium-Suspension nur noch autoclaviert nach einwandfreien Sterilitätsproben verwandt werden konnte.

Gesamteiweißbestimmung der drei normalen Hammelsera vor Beginn der Immunisierung

Methode wie bei den Kaninchenеiweißauswertungen (III. 2).

Ha. Ser. Nr. 156

	6,80%		
10,7350		10,1476	
10,6006		10,0100	
0,1344		0,1376	
0,0672		0,0688	
0,72%		6,88%	
			Mittelwert = 6,89%

Ha. Ser. Nr. 157

	6,745%		
10,1748		15,0378	
10,0382		14,9046	
0,1366		0,1332	
0,0683		0,0666	
6,83%		6,66%	
			Mittelwert = 6,745%

Ha. Ser. Nr. 158

	7,00%		
13,4130		14,5736	
13,2698		14,4368	
0,1432		0,1368	
0,0716		0,0684	
7,16%		6,84%	
			Mittelwert = 7,00%

Gravimetrische Eiweißbestimmung der Sera nach Fällung mit Ammoniumsulfat in verschiedenen Sättigungsgraden

Ha. Ser. Nr. 156

Angewandte Flüssigkeitsmenge + Aqua dest. zur Auffüllung, auf 15 cc. Volumen.

1.	6,5	cc.	+	8,5	cc.	Aqua dest.
2.	6,0	„	+	9,0	„	„ „
3.	6,0	„	+	9,0	„	„ „
4.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
5.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
6.	6,0	„	+	9,0	„	„ „
7.	6,5	„	+	8,5	„	„ „
8.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
9.	3,5	„	+	11,5	„	„ „
10.	4,5	„	+	10,5	„	„ „

Gewichtsprozente:

1.
10,1510
10,0496
0,1014
10,14 . 4 / 6,5 = 6,24%

2.
10,1262
10,0412
0,0850
8,5 . 4 / 6 = 5,66%

3.
10,0382
9,9638
0,0744
7,44 . 4 / 6 = 4,96%

4.
14,9764
14,9190
0,0570
5,7 . 4 / 5 = 4,56%

5.
10,6860
10,6380
0,0480
4,8 . 4 / 5 = 3,84%

6.
10,1012
10,0500
0,0512
5,12 . 4 / 6,5 = 3,14%

7.
14,8626
14,8102
0,0524
5,24 . 4 / 6,5 = 3,2%

8.
13,8502
13,8114
0,0388
3,88 . 4 / 5 = 3,1%

9.
9,9678
9,9418
0,0260
2,6 . 4 / 3,5 = 2,9%

10.
13,8100
13,7810
0,0290
2,9 . 4 / 4,5 = 2,5%

Ha. Ser. Nr. 157

Angewandte Flüssigkeitsmenge + Aqua dest.

1.	3,5 cc.	+	11,5 cc.	Aqua	dest.	
2.	6,5 „	+	8,5 „	„	„	
3.	4,5 „	+	10,5 „	„	„	
4.	5,0 „	+	10,0 „	„	„	
5.	5,5 „	+	9,5 „	„	„	
6.	6,0 „	+	9,0 „	„	„	
7.	5,0 „	+	10,0 „	„	„	
8.	4,5 „	+	10,5 „	„	„	
9.	3,5 „	+	11,5 „	„	„	
10.	4,5 „	+	10,5 „	„	„	

Gewichtsprozente.

1.
10,6840
10,6276
0,0564
5,64 . 4 = 6,445%
3,5

2.
10,0300
9,9368
0,0932
9,32 . 4 = 5,735%
6,5

3.
10,2166
10,1574
0,0592
5,92 . 4 = 5,24%
4,5

4.
10,1250
10,0668
0,0582
5,82 . 4 = 4,656%
5

5.
14,9510
14,8958
0,0552
5,52 . 4 = 4,01%
5,5

6.
13,3482
13,2910
0,0572
5,72 . 4 = 3,81%
6

7.
14,8172
14,7748
0,0424
4,24 . 4 = 3,392%
5

8.
13,8576
13,8216
0,0360
3,6 . 4 = 3,2%
4,5

9.
13,0000
12,9738
0,0262
2,62 . 4 = 2,99%
3,5

10.
14,4518
14,4254
0,0264
2,64 . 4 = 2,34%
4,5

Ha. Ser. Nr. 158

Angewandte Füssigkeitsmenge + Aqua dest.

1.	6,0	cc.	+	9,0	cc.	Aqua dest.
2.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
3.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
4.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
5.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
6.	6,0	„	+	9,0	„	„ „
7.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
8.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
9.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
10.	5,0	„	+	10,0	„	„ „

Gewichtsprozente:

1.
10,0856
9,9860
0,0996
9,96 . 4 / 6 = 6,64%

2.
10,1156
10,0452
0,0704
7,04 . 4 / 5 = 5,632%

3.
10,0914
10,0330
0,0584
5,84 . 4 / 5 = 4,672%

4.
10,7100
10,6550
0,0550
5,5 . 4 / 5 = 4,4%

5.
13,8680
13,8202
0,0478
4,78 . 4 / 5 = 3,822%

6.
14,8602
14,8086
0,0516
5,16 . 4 / 6 = 3,44%

7.
13,3014
13,2608
0,0406
4,06 . 4 / 5 = 3,248%

8.
14,4644
14,4322
0,0322
3,22 . 4 / 5 = 2,576%

9.
14,9354
14,9076
0,0278
2,78 . 4 / 5 = 2,224%

10.
12,9638
12,9556
0,0082
0,82 . 4 / 5 = 0,656%

Nach einer Immunisierungsdauer von 3 Monaten.

Gesamteiweißbestimmung der drei Hammelsera

Ha. Ser. Nr. 156
11,5930
11,4520
0,1410
14,10 / 2 = 7,05%

Ha. Ser. Nr. 157
12,2136
12,0732
0,1404
14,04 / 2 = 7,02%

Ha. Ser. Nr. 158

14,9618
14,8178
0,1440
14,40 = 7,20%
2

Gravimetrische Eiweißbestimmung der Sera nach Fällung mit Ammonsulfat in verschiedenen Sättigungsgraden

Ha. Ser. Nr. 158

1.

Angewandte Flüssigkeitsmenge + Aqua dest.

1.	6,0	cc.	+	9,0	cc.	Aqua dest.
2.	6,0	„	+	9,0	„	„ „
3.	6,0	„	+	9,0	„	„ „
4.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
5.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
6.	4,0	„	+	11,0	„	„ „
7.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
8.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
9.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
10.	4,0	„	+	11,0	„	„ „

Gewichtsprozente:

1.
14,5544
14,4588
0,0956
9,56 . 4 = 6,373%
6

2.
14,8914
14,8056
0,0858
8,58 . 4 = 5,72%
6

3.
11,5344
11,4622
0,0722
7,22 . 4 = 4,81%
6

4.
12,8434
12,7886
0,0548
5,48 . 4 = 4,38%
5

5.
14,2946
14,2446
0,0500
5,00 . 4 = 4,00%
5

6.
12,4428
12,4058
0,0370
3,7 . 4 = 3,7%
5

7.

15,1206
15,0784
0,0422

$\frac{4{,}22 \cdot 4}{5} = 3{,}37\%$

8.

10,0668
10,0286
0,0382

$\frac{3{,}82 \cdot 4}{5} = 3{,}05\%$

9.

10,1718
10,1422
0,0296

$\frac{2{,}96 \cdot 4}{5} = 2{,}36\%$

10.

21,5196
21,5068
0,0128

$\frac{1{,}28 \cdot 4}{4} = 1{,}28\%$

Ha. Ser. Nr. 156

Angewandte Flüssigkeitsmenge + Aqua dest.

1.	6,0	cc.	+	9,0	cc.	Aqua dest.
2.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
3.	6,0	„	+	9,0	„	„ „
4.	6,0	„	+	9,0	„	„ „
5.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
6.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
7.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
8.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
9.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
10.	4,0	„	+	11,0	„	„ „

Gewichtsprozente:

1.

11,6310
11,5312
0,0998

$\frac{9{,}98 \cdot 4}{6} = 6{,}65\%$

2.

12,1592
12,0832
0,0760

$\frac{7{,}6 \cdot 4}{5} = 6{,}08\%$

3.

15,2532
15,1746
0,0786

$\frac{7{,}86 \cdot 4}{6} = 5{,}24\%$

4.

14,8862
14,8136
0,0726

$\frac{7{,}26 \cdot 4}{6} = 4{,}8\%$

5.

14,5890
14,5340
0,0550

$\frac{5{,}5 \cdot 4}{5} = 4{,}4\%$

6.

14,3988
14,3480
0,0508

$\frac{5{,}08 \cdot 4}{5} = 4{,}06\%$

7.

12,9116
12,8670
0,0446
4,46 . 4 = 3,568%
5

8.

10,0796
10,0396
0,0400
4,0 . 4 = 3,2%
5

9.

10,1470
10,1158
0,0312
3,12 . 4 = 2,496%
5

10.

21,5820
21,5730
0,0090
0,9 . 4 = 0,9%
4

Ha. Ser. Nr. 157

Angewandte Flüssigkeitsmenge + Aqua dest.

1.	5,0	cc.	+	10,0	cc.	Aqua dest.
2.	3,5	„	+	11,5	„	„ „
3.	2,5	„	+	12,5	„	„ „
4.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
5.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
6.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
7.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
8.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
9.	5,0	„	+	10,0	„	„ „
10.	4,0	„	+	11,0	„	„ „

Gewichtsprozente:

1.

11,6562
11,5746
0,0816
8,16 . 4 = 6,528%
5

2.

14,3046
14,2524
0,0522
5,22 . 4 = 5,22%
4

3.

10,2008
10,1692
0,0316
3,16 . 4 = 5,05%
2,5

4.

12,1242
12,0654
0,0588
5,88 . 4 = 4,704%
5

5.

14,9302
14,8782
0,0520

$$\frac{5{,}20 \cdot 4}{5} = 4{,}16\%$$

6.

14,4784
14,4270
0,0514

$$\frac{5{,}14 \cdot 4}{5} = 4{,}11\%$$

7.

15,2666
15,2210
0,0456

$$\frac{4{,}56 \cdot 4}{5} = 3{,}64\%$$

8.

10,2790
10,2406
0,0384

$$\frac{3{,}84 \cdot 4}{5} = 3{,}07\%$$

9.

12,8828
12,8492
0,0336

$$\frac{3{,}36 \cdot 4}{5} = 2{,}68\%$$

10.

21,6512
21,6432
0,0080

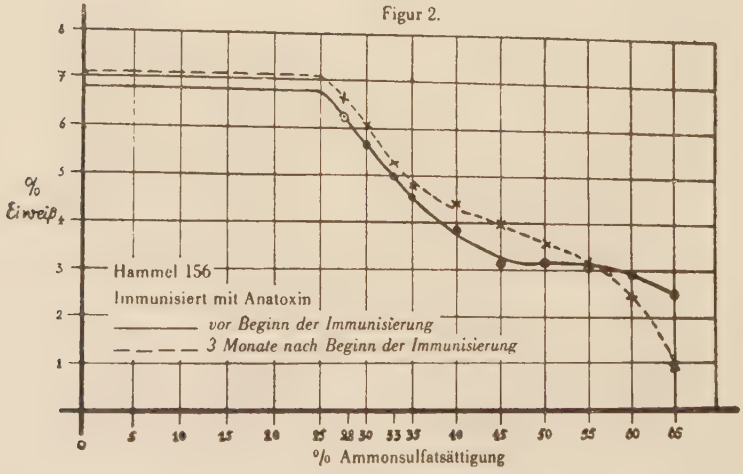
$$\frac{0{,}80 \cdot 4}{4} = 0{,}8\%$$

Vergleichskurven der drei Hammelsera vor Beginn und drei Monate nach der Immunisierung.

Gesamteiweiß und Eiweißgehalt der Zentrifugate der Ammoniumsulfatfällungen.

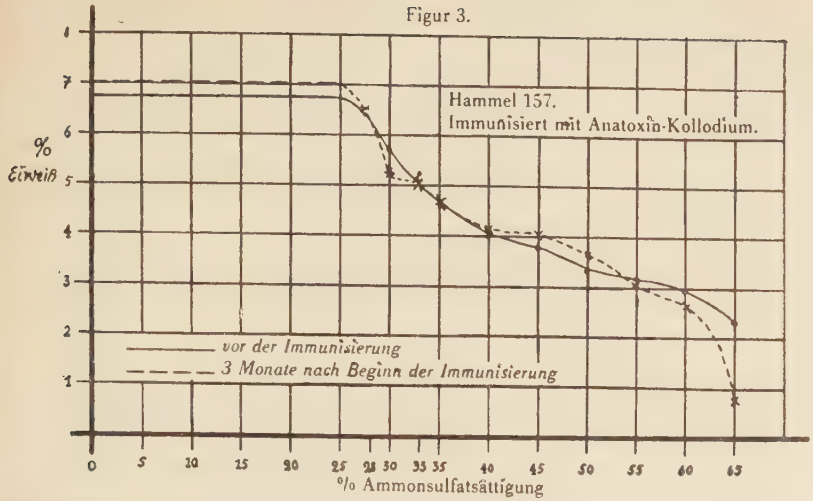
Ha. Ser. Nr. 156

Figur 2.



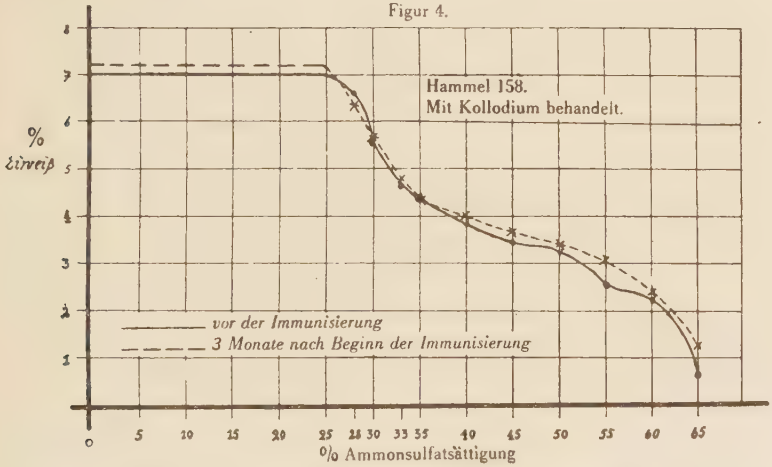
Ha. Ser. Nr. 157

Figur 3.



Ha. Ser. Nr. 158

Figur 4.



durchgezogen: Normalserum vor der Immunisierung
gestrichelt: Serum drei Monate nach der Immunisierung.

156: Imm. mit Anat. + NaCl cc.
157: Imm. mit Anat. + Koll.-Susp. cc.
158: Imm. mit Koll.-Susp. + NaCl cc.

Aus unbekannten Gründen ist im Verlauf der Immunisierung bei allen Tieren der Gesamteiweißgehalt des Serums um 0,2 bis 0,3% gestiegen.

Zur besseren Übersicht ist weiter unten eine Tabelle angeführt, aus der die relative Verschiebung der Eiweißgehalte der einzelnen Fraktionen besser hervorgeht.

Daraus ist zu ersehen: Es ist durch die Immunisierung eine erhebliche Verschiebung der Serumeiweißfraktionen eingetreten, das Pseudoglobulin hat auf Kosten des Albumins zugenommen.

Bei dem Hammel 157 (Immunisierungsgang: Diphtherie-Anatoxin mit Kollodium) sind die lyophoben Globuline stark vermehrt.

Die Injektion von reiner Kollodiumsuspension hat keine wesentliche Änderung in der Zusammensetzung des Serumeiweißes bei Hammel 158 verursacht.

Der Gehalt an Antitoxinen wurde während des Immunisierungsganges bei allen 3 Tieren monatlich geprüft.

	Hammel		
Nach	156	157	158
1	—	—	—
2	1/10	1/20	—
3	1	1	—
5	3	3	—
6	3	3	—
7	3	3	—
10	3	3	—
Monaten		AE/cc.	

Nach 3monatiger Immunisierungsdauer enthielt das Serum also 3 AE/cc. bei Hammel 156 und 157.

Erst 3 Wochen nach der Serumeiweißprüfung wurde diesen beiden Tieren erneut Blut abgenommen, um nicht in eine durch diesen vorhergehenden (zur Eiweißbestimmung vorgenommenen) Blutentzug etwa entstandene Regenerationsphase zu geraten, die eine störende Verschiebung in der Eiweißzusammensetzung bedingen konnte.

Von jedem der beiden Hammel wurden 600 ccm Blut genommen und daraus ca. 200 ccm Serum erzielt.

Von diesen Sera wurden je 30 ccm mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, und zwar in

30-, 35-, 40-, 45-, 50- und 60prozentigen

Sättigungen.

Diese Mengen standen 24 Stunden verschlossen bei Zimmertemperatur. Ihre Niederschläge, die durch Filtration auf Papierfiltern gewonnen wurden, wurden in Cellophanschläuchen dialysiert.

Nach der Dialyse fanden dann die Antitoxinbestimmungen in der intrakutanen Auswertung am Meerschweinchen statt.

Vorgehen im einzelnen:

Fällungsschema:

Sättigungsgrad	Angewandte Serummenge	Verdünnungswasser	Gesättigte Ammonsulfatlösung
in %	in cc.	in cc.	in cc.
30%	30	54	36
35%	30	48	42
40%	30	42	48
45%	30	36	54
50%	30	30	60
60%	30	18	72

Als letztes wurde die Ammoniumsulfatlösung unter Umrühren mit dem Glasstab hinzugesetzt. Die Gläser mit den jeweiligen Mengen standen verschlossen 24 Stunden. Da Zentrifugieren aus technischen Gründen nicht möglich war, geschah

Filtration durch gehärtete Papierfilter.

Die Filter wurden mitsamt den Rückständen in verschließbare Behälter gebracht, und unter Chloroformzusatz etwa 25 cc. Aqua dest. zugefügt. Zur Entsalzung hingen 12 Cellophanschläuche mit diesen Flüssigkeiten in fließendem Wasser (Leitungswasser). Zwischendurch Prüfung der Außenflüssigkeit mit Bariumacetat bis zum negativen Ausfall der Probe auf Sulfationen.

Die Flüssigkeiten wurden dann nach Auffüllung auf je 90 cc. Volumen mit gesättigter NaCl-Lösung in der Weise besalzen, daß auf 100 cc. Volumen 2,7 cc. ges. NaCl gegeben wurden.

Antitoxingehalt in den einzelnen Fraktionen.

Ln-Wert nach Intrakutanverfahren am Meerschweinchen

Römersche Methode.

Ha. Ser.			156	157
Fraktionen:	30%	=	¼ AE	½ AE
	35%	=	¼ AE	½ AE
	40%	=	½ AE	¾—1 AE
	45%	=	¾ AE	1 AE
	50%	=	1 AE	¾—½ AE
	60%	=	¾—1 AE	½ AE

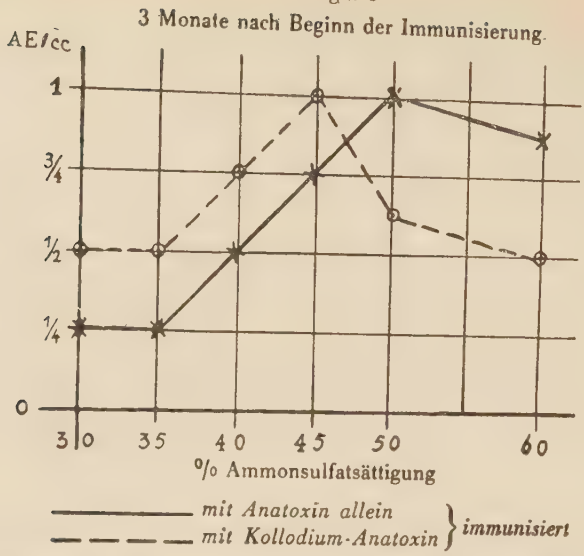
Antitoxingehalt der Filterrückstände

der Ammoniumsulfatfraktionen der Hammelsera Nr. 156 und 157 nach dreimonatiger Immunisierung.

durchgezogen: mit Anatoxin allein

gestrichelt: mit an Kollodiumsuspension gebundenem Anatoxin.

Figur 5



Aus vorstehendem Kurvenbild ist eine verschiedene Verteilung der Antitoxine in den einzelnen Fraktionen ersichtlich. Beide Tiere hatten aber gleiche Antitoxinmengen intravenös injiziert bekommen nach gleichem Immunisierungsschema, bei beiden Tieren war im Vollserum rein zufällig der Antitoxintiter (= 3 AE/cc.). Ungeklärt bleibt, warum in den Fraktionen der stärkeren Ammoniumsulfatkonzentrationen in beiden Fällen der Antitoxintiter abgesunken ist, da doch eigentlich der Fraktionierungsart entsprechend in jeder nächst höheren Konzentration die Antitoxine der vorausgehenden Fraktionen rein zahlenmäßig mit vorhanden sein mußten.

Bei dem Serum des mit Antitoxin allein immunisierten Hammel 156 befindet sich das Maximum an Anatoxin in der 50prozentigen Ammoniumsulfatsättigung, die der Pseudoglobulinfraktion entspricht.

Im Serum des mit Anatoxin-Kollodium behandelten Hammel 157 liegt die Hauptmenge der Antitoxine schon in der 45prozentigen Sättigung mit Ammoniumsulfat, hier enthalten die lyophoberen Globuline, die den 30- und 35prozentigen Sättigungsgraden entsprechen, relativ mehr Antitoxin als beim Hammel 156. 10 Monate nach dem Immunisierungsbeginn — seitdem waren die intravenösen Einspritzungen von Anatoxin (156) Kollodium-Anatoxin (157) und reinem Kollodium (158) fortgesetzt worden — wurden diesmal mit dem Blut des gleichen Aderlasses gleichfalls Auswertungen vorgenommen, den drei Hammeln dazu je 500 ccm Blut entnommen und aus den gewonnenen Sera zunächst wieder eine Gesamteiweißbestimmung gemacht und der Gesamt-Antitoxingehalt intrakutan am Meerschweinchen bestimmt.

Wiederum nach Fraktionierungen von 28—65prozentiger Sättigung mit Ammoniumsulfat, aus diesen Fraktionen Bestimmung des Eiweiß- und des Antitoxingehaltes.

Die Methode im einzelnen war die gleiche wie die der vorausgegangenen Auswertungen lediglich mit folgenden Abweichungen:

1. Bei der Antitoxinbestimmung intrakutan am Meerschweinchen wurden die einzelnen Fraktionen zuvor nach 24stündigem Stehen nicht einer Filtrierung durch gehärtetes Papierfilter unterworfen und die so gewonnenen Fällungen dann dialysiert, sondern sie wurden bei 11 000 Umdrehungen über 12 Minuten zentrifugiert, die Bodensätze am Tier intrakutan sofort ohne Dialyse nach Auffüllen auf die Ausgangsmenge mit NaCl ausgewertet.

Die Dialyse war hier unnötig, da bei den Auswertungen in den erforderlichen hohen Verdünnungen das Ammoniumsulfat ohne Bedeutung, da nur in Spuren vorhanden, war.

2. Bei der Eiweißbestimmung wurde ein „Licht-elektrischer Kolorimeter" verwandt, das unter III. 2. mitsamt der Arbeitsmethode beschrieben ist.

Die Ergebnisse der Eiweißbestimmungen, Gesamteiweiß und Eiweißprozente aus den einzelnen Fraktionen:

Fraktionen

	28%	30%	33%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%	Gesamt-Eiweiß
Hammel 156 E-Zeigerstand im Kolorimeter	0,370	0,340	0,310	0,285	0,275	0,26	0,24	0,22	0,19	0,15	0,385
Prozente	5,68	5,25	4,75	4,35	4,16	4,0	3,7	3,4	3,0	2,34	5,94%
Hammel 157 E-Zeigerstand im Kolorimeter	0,4175	0,40	0,365	0,30	0,235	0,205	0,165	0,095	0,0625	0,0425	0,46
Prozente	6,57	6,15	5,55	4,62	3,7	3,15	2,5	1,40	0,95	0,06	7,06%
Hammel 158 E-Zeigerstand im Kolorimeter	0,345	0,340	0,32	0,2835	0,24	0,225	0,21	0,165	0,14	0,115	0,375
Prozente	5,31	5,25	4,8	4,5	3,66	3,4	3,25	2,55	2,15	1,73	5,79%

Fraktionen entsprechend den Ammoniumsulfatkonzentrationen in Prozenten.

Hammel	0—30	30—33	33—45	45—65	65—100	Gesamteiweiß
156 Beginn (Anat.)	1,14	0,7	1,82	0,64	2,50	6,8 %
3 Monate	0,97	0,84	1,18	3,16	0,9	7,05%
10 Monate	0,59	0,60	0,75	1,66	2,34	5,94%
157 Beginn	1,01	0,5	1,43	1,47	2,34	6,75%
(Koll. 3 Monate	1,80	0,17	0,95	3,31	0,8	7,0 %
Anat.) 10 Monate	0,91	0,6	2,40	2,49	0,66	7,06%

Hammel	0—30	30—33	33—45	45—65	65—100	Gesamteiweiß
158 Beginn	1,37	0,96	1,23	2,78	0,66	7,0 %
(Kollodium) 3 Mon.	1,38	0,91	1,11	2,42	1,28	7,2 %
10 Mon.	0,54	0,45	1,4	1,67	1,73	5,79%

In der letzten Tabelle sind die Ergebnisse der Eiweißuntersuchungen zu Beginn und im Verlauf der Immunisierung nach 3 und 10 Monaten gegenübergestellt.

Wieder aus ungeklärten Gründen hat bei Hammel 156 und 158 das Gesamteiweiß des Serums abgenommen, beim Hammel 157 ist es annähernd unverändert geblieben.

Die Zahlen zeigen den Eiweißgehalt der Fraktionen in Teilen des Gesamteiweißgehaltes.

Beim Hammel 156 (Anatoxin allein) ist die größte Eiweißmenge in der Fraktion, die dem Serumalbumin entspricht, enthalten. Das Pseudoglobulin hat mengenmäßig abgenommen.

Beim Hammel 157 ist das Maximum an Eiweiß weiter zum Euglobulin hin verschoben, es ist jetzt in der 33—45prozentigen Ammonsulfatsättigung fast ebenso viel Eiweiß ausgefallen wie in der Fraktion zwischen 45 und 65 Prozent.

Relativ viel Eiweiß ist auch in der dem lyophoben Globulin entsprechenden 0—30prozentigen Fraktion.

Bei dem nur mit Kollodium behandelten Tiere (Hammel 158) hat das Globulin ab-, die Albuminmenge zugenommen.

Die Anatoxinauswertungen wurden in gleicher Art vorgenommen wie in den Versuchen vorher.

Beim Hammel 158 ließ sich erwartungsgemäß kein Antitoxin im Serum nachweisen.

Hammelsera 156 und 157 hatten beide einen Gesamtantitoxingehalt von nur 3 AE/cc. Dieser relativ niedrige Titer ist wohl nur Folge der intravenösen Injektionsart.

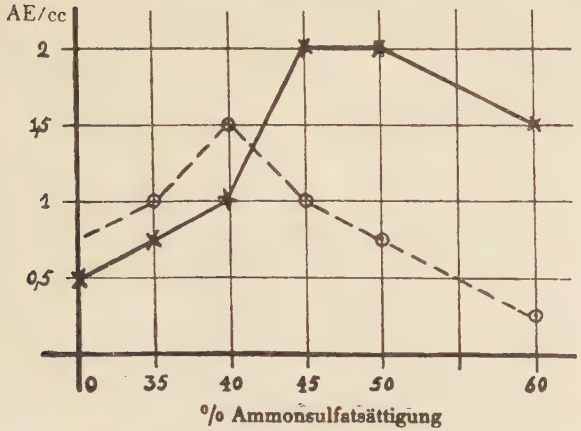
Die Verteilung in den Fraktionen war folgende:

	Hammel--Serum	156	157
Fraktionen:	30%	½ AE	¾ AE
	35%	¾ AE	1 AE
	40%	1 AE	1½ AE
	45%	2 AE	1 AE
	50%	2 AE	¾ AE
	60%	1½ AE	½ AE

Kurvenbild 6 zeigt die Verteilung der Antitoxine auf die einzelnen Eiweißfraktionen.

Figur 6

10 Monate nach Beginn der Immunisierung



Wiederum liegt beim Hammel 157 der größte Antitoxingehalt in einer Fraktion, die im Vergleich zum Hammel 156 weiter nach links, dem lyophoben Globulin zu, verschoben ist. Durch die über 10 Monate weitergeführte Immunisierung ist bewirkt worden, daß beim Hammel 157 gegenüber dem Befund nach 3 Monaten die Verschiebung nach links noch zugenommen hat.

Damit dürfte experimentell die eingangs angeführte Annahme bestätigt sein, daß durch Vergrößerung der Antigenmizellen des Anatoxins sich der Globulincharakter der Antitoxine ändert.

V. Zusammenfassung.

Es wurden durch Bindung an eine Kollodiumsuspension die Mizellen eines Tetanus- bzw. Diphtherieformoltoxoids vergrößert. Mit diesen vergrößerten Toxinmizellen als Antigenen wurden intravenöse Immunisierungsversuche an Kaninchen und Hammeln mit entsprechenden Kontrollen vorgenommen.

Bei den erzielten Sera ist in verschiedenen Fraktionen mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung eine Eiweißverschiebung und eine veränderte Antitoxinverteilung festgestellt worden, was zur Frage der Beziehungen zwischen Antigen und Antikörper und zum Problem der Vielheit oder Einheitlichkeit der Antikörperarten ein großes Interesse hat, wie schon in der Einleitung angeführt wurde.

Die Antitoxine nehmen unter den Antikörperarten eine Sonderstellung ein, die allerdings durch die Toxin-Antitoxinflockung eine Einschränkung erfahren hat, insofern, als es Antitoxine gibt, die in vitro flocken und solche, die keine Flockung zeigen. Und das ist abhängig von dem physikalischen Charakter des antitoxischen Globulins.

In vorliegender Arbeit sollte gezeigt werden, daß der Globulincharakter des Antitoxins wenigstens zum Teil von der Größe der Antigenmizelle abhängt.

Daraus ließe sich folgern: Je kleiner die Toxinmizelle wird, je reiner sich also ein Toxin herstellen läßt, um so mehr werden Antitoxine, die an hydrophile Globuline gebunden sind, gebildet.

Aus dem Ganzen ließe sich jedenfalls schließen, daß die Antitoxine dadurch, daß sie Pseudoglobulincharakter haben, unter den Antikörpern nur scheinbar eine Sonderstellung einnehmen, nämlich nur bedingt durch die kleinere Mizellengröße ihrer Antigene. Durch deren Vergrößerung gelangt man zu Antitoxinen mit besserer Eignung zu Antigen-Antikörperreaktionen in vitro, wie Präzipitation und Komplementbindung.

Und das entspräche der von H. Schmidt aufgestellten Hypothese:

„Die Größe der Mizelle des Antigens entscheidet über den Globulincharakter des Antikörpers, und der Globulincharakter entscheidet über die Art der Reaktionsfähigkeit mit dem Antigen in vivo und in vitro."

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. Schmidt für die freundliche Überlassung des Themas, für die Übernahme des Referates und für die jederzeit liebenswürdige Hilfe bei der Durchführung der Versuche und Abfassung der Arbeit meinen herzlichen Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

J. Freund: J. exper. Med. 1932, 55, 181.

J, Loeb: J. gen. Physiol. 1922—23, 5, 109.

H. Schmidt: Die Praxis der Auswertung von Toxinen und Antitoxinen, 1931, Verlag Fischer, Jena.

H. Schmidt: Fortschritte der Serologie, 1933, Verlag Steinkopff, Dresden.

H. Schmidt: Zeitschr. für Hyg. u. Infekt.-Krankh., 1930, 111, 542.

H. Schultze und H. Groß: Fraktionierung und Konservierung haemolytischer Immunsera.

Biochem. Zeitschr. 1929, 215, 115.

Lebenslauf.

Ich, Heinrich August Friedrich W i l h e l m Niemeyer, wurde am 23. Dezember 1907 zu Eidinghausen, Kreis Minden, als Sohn des Polizei-Inspektors Heinrich Niemeyer und seiner Ehefrau Wilhelmine geb. Clamor, geboren, bin evangelisch, arischer Abstammung und besitze die Deutsche Staatsangehörigkeit.

In Wattenscheid besuchte ich die Altstadtschule und im Anschluß daran das dortige Gymnasium Marcanum, wo ich Ostern 1928 die Reifeprüfung bestand.

In Marburg verbrachte ich zum Studium der Medizin meine fünf vorklinischen Semester, machte dort 1930 mein Physikum, war im ersten klinischen Semester, Winter 1930/31 in Innsbruck (Leopold-Franzens-Universität) und dann wieder in Marburg, wo ich mein Staatsexamen Januar 1934 beendete.

Im praktischen Jahr war ich in den Städtischen Krankenanstalten in Bremen, 4 Monate an der Medizinischen, die übrige Zeit und nach erfolgter Approbation 3 Monate als Volontär an der Chirurgischen Klinik tätig.

Seit dem 1. Juni 1935 habe ich eine chirurgische Assistenzarztstelle am Evgl. Diakonissenhaus in Bremen inne.

Meine akademischen Lehrer waren in Jnnsbruck: Gaisböck, Lang, Petschacher, Ranzi, Steyrer. In Marburg vorklinisch: Alverdes, v. Auwers, Claußen, Dittler, Göppert, Grüneisen, Jacobshagen, Kutscher, Meerwein, Nauck, Strecker; klinisch: Arndt, Baur, Böminghaus, Brock, Burkhardt, Eimer, Freudenberg, Göppert, Grüter, Hildebrand, Kehrer, Klapp, Klewitz, Kretschmer, Loebell, Mauz, Neujoks, Neumann, Pfannenstiel, Rix, Ruete, Schmidt, Schwenkenbecher, Schubert, Uffenorde, Versé, Wiedhopf.